

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



EPO - Munich
 20

14. Juni 2000

EPO 1806
Bescheinigung

EPO 1806
REC'D 30 JUN 2000

WIPO

PCT

Herr Rainer Heintzmann in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Erhöhung der Auflösung optischer Abbildung"

am 2. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 02 B 27 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 11. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

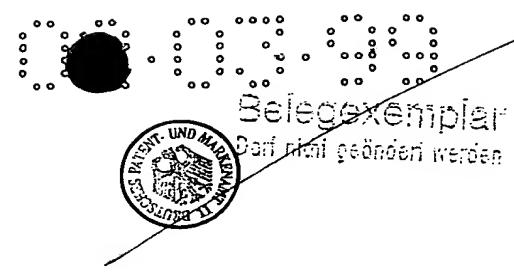
Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 08 883.7



Weihmeyer



Zusammenfassung der Erfindung nach § 36 PatG

1. März 1999

1 Bezeichnung

Verfahren zur Erhöhung der Auflösung optischer Abbildung

2 Kurzfassung

2.1 Technische Aufgabe und Zielsetzung

In den üblichen Verfahren optischer Abbildung ist die erreichbare Auflösung durch die numerische Apertur der Linse und die Wellenlänge des abbildenden Lichts begrenzt. Dieses drückt sich darin aus, daß nur ein kleiner Bereich von Raumfrequenzen, aus denen sich das Objekt (über Fouriertransformation) zusammengesetzt denken läßt, durch das optische System übertragen werden kann. Das neue Verfahren soll es ermöglichen, diesen übertragbaren Raumfrequenzbereich substantiell zu erweitern, um damit unter anderem die Auflösung der Abbildung zu erhöhen.

2.2 Lösung des Problems

Durch Ausnutzen eines nichtlinearen Zusammenhangs zwischen im Objekt emittiertem Licht und dem lokalen Wert einer weiteren räumlich veränderlichen Größe (z.B. der lokalen Einstrahlungsintensität) läßt sich der übertragbare Raumfrequenzbereich beträchtlich erweitern. Durch lokale Variation dieser Einflußgröße und die Aufnahme verschiedener Bilder läßt sich ein Bild des Objekts rekonstruieren, dessen Auflösung auf Grund der Nichtlinearität fundamental höher ist als die durch das Abbe-Limit gegebene. In der Erfindung werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben solche nichtlinearen Effekte zu erzeugen und verschiedene Arten der Datenauswertung um Bilder zu rekonstruieren.

2.3 Anwendungsgebiet

Die Verbesserung der Auflösung optisch abbildender Systeme (z.B. im Bereich der Mikroskopische Analyse in der Biologie oder Halbleitertechnik).

3 Zeichnung

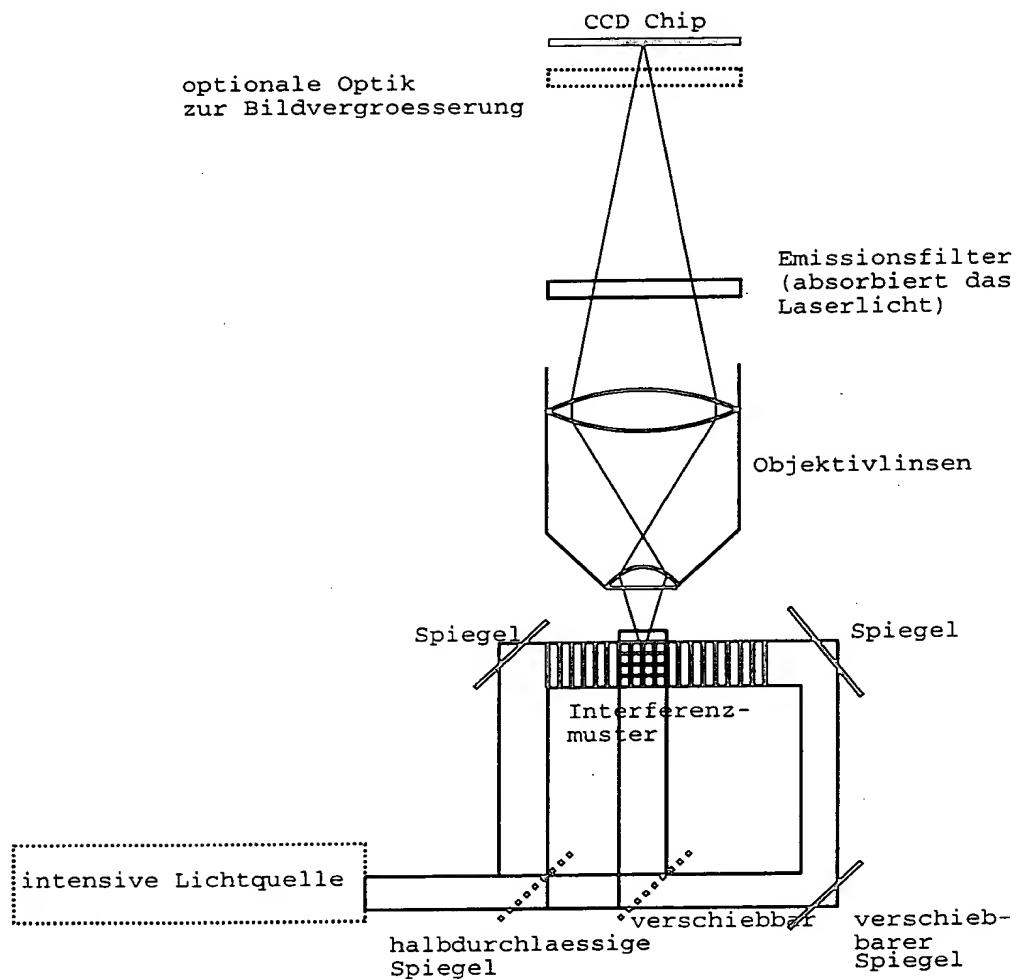


Abbildung 1: Eine schematische Darstellung der Anwendung des Verfahrens auf die 3D-Mikroskopie bei Beleuchtung durch drei miteinander interferierende Lichtstrahlen. Die Strahlen interferieren nur über einen Bereich, der in der Größenordnung der Kohärenzlänge der Lichtquelle liegt.

Verfahren zur Erhöhung der Auflösung optischer Abbildung

1. März 1999

Anmelder:

Rainer Heintzmann
Mönchhofstr. 3A
D-69120 Heidelberg

Erfinder:

Rainer Heintzmann
Mönchhofstr. 3A
D-69120 Heidelberg,

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Mombertplatz 23
D-69126 Heidelberg

1 Grundlagen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Lichtmikroskopie entsprechend dem Oberbegriff des Anspruchs I.

Die Auflösung von optischen Systemen, wird oft wesentlich durch die objektseitige Apertur der Objektivlinse/n bestimmt. Licht, welches vom Objekt abgestrahlt wird, wird nur detektiert, wenn es innerhalb des Akzeptanzwinkels des Objektivs auf dieses trifft. Die Auflösung eines Lichtmikroskops hängt bekannterweise von dem Bereich ab, in dem die lichtoptische Transferfunktion (OTF) des Systems nicht verschwindet. Die OTF gibt an, welche Raumfrequenzen, aus denen sich das Objekt (über Fouriertransformation) zusammengesetzt denken lässt, während der optischen Abbildung erhalten bleiben, und wie sie



dabei geschwächt werden. Verschwindet die OTF an Stellen im reziproken Raum vollständig, so ist es unmöglich, ohne Annahmen über die Struktur des Objektes zu machen, diese Raumfrequenzen in einem Bild zu rekonstruieren. Eine Ausdehnung der OTF auf einen möglichst großen Bereich ist also anzustreben, um die Auflösung des optischen Systems zu erhöhen.

In der Fluoreszenzmikroskopie emittieren Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Intensität, die in erster Näherung proportional zur Intensität des am Ort des Farbstoffes eingestrahlten Lichts ist. Sie tun das im Gegensatz zur Absorptionsmikroskopie, Reflexionsmikroskopie oder auch Phasenkontrastmikroskopie inkohärent zueinander. Wenn man annimmt, daß an einem Punkt im Objekt die ausgestrahlte Fluoreszenzintensität proportional ist zu der dort eingestrahlten Lichtintensität, so läßt sich ein gemessenes Bild $I_m(\vec{x})$ (rückübersetzt in Objektraumkoordinaten \vec{x}) beschreiben, indem man die ortsabhängige Beleuchtungsintensität ($Bel(\vec{x})$) mit der dort vorhandenen Farbstoffkonzentration $Obj(\vec{x})$ multipliziert und das Ergebnis mit der Punktbildfunktion („point spread function“ PSF) des abbildenden Systems faltet.

$$I_m(\vec{x}) = PSF(\vec{x}) \otimes (Bel(\vec{x}) \cdot Obj(\vec{x})) \quad (1)$$

Im reziproken Raum übersetzt sich dies in die Faltung der fouriertransformierten Beleuchtungsfunktion $F(Bel(\vec{x}))$ mit der fouriertransformierten Objektfunktion $F(Obj(\vec{x}))$ und anschließende Multiplikation mit der lichtoptischen Transferfunktion $OTF(\vec{k})$. F bezeichnet hier und im folgenden die Fouriertransformation. Die Koordinaten im reziproken Raum werden mit \vec{k} bezeichnet.

$$F(I_m(\vec{x})) = OTF(\vec{k}) \cdot (F(Bel(\vec{x})) \otimes F(Obj(\vec{x})))$$

Allgemeiner lassen sich viele Mikroskopieverfahren mit der Formel 1 beschreiben, wenn man unter $Obj(\vec{x})$ die jeweilige Dichte der Eigenschaft des Objekts versteht, dies es zu untersuchen gilt und unter $PSF(\vec{x})$ die effektive Punktbildfunktion des gesamten Systems (Bildaufnahme und -rekonstruktion). Bei iterativen oder nichtlinearen Rekonstruktionsverfahren gilt dies oft noch näherungsweise.

In üblichen abbildenden Systemen ist der im Wert von Null verschiedene Bereich (*der Träger*) der OTF durch die numerische Apertur und die Wellenlänge des abzubildenden Lichts auf einen gewissen Bereich eingeschränkt (für genauere Herleitungen und Erläuterungen siehe US-Patent US 5671085). Gleichermassen ist auch die Fouriertransformierte der Beleuchtungsfunktion $F(Bel(\vec{x}))$ in der Ausdehnung ihres Trägers durch die Lichtwellenlänge und, gegebenenfalls, Aperturen des Beleuchtungssystems eingeschränkt.

2 Stand der Technik

2.1 Existente Verfahren

In den letzten Jahren wurden verschiedentlich Systeme ersonnen, um die Auflösung zu verbessern. Dabei spielt die geeignete Wahl der Beleuchtung des Objekts eine große Rolle. So wird beim *konfokalen Mikroskop* mit einem fokussiertem Lichtstrahl das Objekt von einer Seite möglichst punktweise beleuchtet (Patent US4631581) und geeignet abgetastet (gescannt), wobei oft die Detektion mittels einer Blende auf einen kleinen Bereich des Objekts begrenzt wird.

Beim *4Pi-Mikroskop* (Patent EP 0491289 A1) wird von beiden Seiten des Objektes kohärent beleuchtet und je nach Ausführung auch detektiert. Beim Wellenfeldmikroskop wird üblicherweise mit kohärenten ebenen Lichtwellen von gegenüber liegenden Seiten beleuchtet (Patent US 4621911, [8][9]). Beim *I⁵M-Mikroskop* wird sowohl kohärent von zwei Seiten beleuchtet als an auch kohärent detektiert (Patent US[1],[2]) indem die beiden Bilder des Objekts auf einem ortsauf lösenden Detektor zur Interferenz gebracht werden.

Das *Theta-Mikroskop* ([12],[10]) detektiert Licht von 3 Seiten und kann mit konfokaler oder 4Pi-ähnlicher Beleuchtung arbeiten. Da bei der Detektion „von der Seite“ die Auflösung entlang der optischen Achse der Beleuchtung besonders groß ist erhält man insgesamt ein kleineres Fokusvolumen.

Des weiteren wurden in der stereomikroskopischen *Oberflächentopographie* Verfahren unter Benutzung von räumlich variierender Beleuchtung (z.B. sinusförmig) eingesetzt. Durch Verrechnung der beiden gemessenen Bilder kann dann sehr genau auf die Oberflächenstruktur geschlossen werden (Patent US 4525858, [16]).

Ein Verfahren, daß „optisches Schneiden“ und somit hochauflösende dreidimensionale Bildgebung ähnlich des konfokalen Mikroskops ermöglicht ist durch Patent WO 97/31282 bekannt geworden. Es basiert auf der Aufnahme mehrerer Bilder mit jeweils unterschiedlichem Muster aus Beleuchtungslochblenden und zugehörigen Detektionslochblenden. Durch geeignete Rekonstruktionsverfahren lässt sich aus den aufgenommenen Daten ein Bild berechnen, das dem eines konfokalen Mikroskops äquivalent ist (*aperture correlation microscopy*, siehe auch [7],[15]). In Patent WO 98/45745 ist ein Verfahren beschrieben, welches auf Beleuchtung unter Abbildung eines Beugungsgitters oder auf zwei interferierenden Laserstrahlen beruht (siehe auch [14]). Zur lateralen Auflösungserhöhung wurde ein ähnliches Verfahren eingesetzt in [4].

Es gibt Verfahren, die sich auf nichtlineare Effekte in der Mikroskopie beziehen. Zu nennen ist hier die Mehrphotonen Mikroskopie (Patent US 5034613, Patent US 5777732, [6],[3], Patent US 5828459). Hier wird ein konfokaler Effekt erreicht durch die gleichzeitige Absorption mehrere Photonen mit entsprechend reduzierten Energien. Andere Techniken benutzen die stimuliert Emission (Patent US 5731588, DE 4416558 A1) oder das Entfölkern des Grundzustandes der Fluoreszenzmoleküle, indem diese bewußt in den längerlebigen Tripplettzustand gepumpt werden [5].

2.2 Nachteile existenter Verfahren

Die beschriebenen Verfahren bringen alle recht großen technischen Aufwand mit sich. So gestaltet sich die Justierung von 4Pi, I^5M und Thetamikroskop sehr schwierig. Die Verfahren sind zudem auch aufwendig in der Herstellung, da sie sich nur unter oft großem Aufwand in vorhandene Mikroskopsysteme integrieren lassen. Beim Wellenfeldmikroskop ist es ein großes Problem, daß die OTF in axialer Richtung Bereiche aufweist, an denen sie verschwindet. Des Weiteren bringt das Wellenfeldmikroskop, wie auch 4Pi-Mikroskopie in lateraler Richtung keinen Auflösungsgewinn gegenüber herkömmlicher Epi-Fluoreszenzmikroskopie bzw. konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Viele Verfahren (konfokale Laserscanning-, 4Pi-, Thetamikroskopie) sind damit verbunden, daß das Objekt punktweise abgerastert wird. Dies nimmt Zeit in Anspruch und bereitet insbesondere bei der Bildgebung zeitabhängige Vorgänge Probleme. Außerdem benötigen abtastende Verfahren sehr schnelle Detektoren (z.B. Photomultiplier), die aber gegenüber langsameren Detektoren mit Ortsauflösung (z.B. CCDs) oft eine deutlich niedrigere Detektionseffizienz haben. Bei der Fluoreszenzmikroskopie kommt noch erschwerend hinzu, daß die sinnvolle Beleuchtungsstärke durch die maximale Anregungsrate der Farbstoffe im Fokus begrenzt ist, was der maximalen Abtastgeschwindigkeit weitere Grenzen setzt.

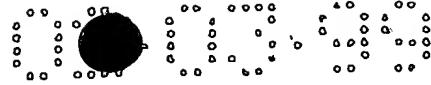
Bei den topographischen Verfahren wurde bisher nicht erkannt, daß eine ähnliche Versuchsanordnung in der hochauflösenden Mikroskopie dazu imstande wäre, lateral und axial den Bereich der gemessenen Raumfrequenzen beträchtlich zu erweitern, insbesondere wenn nichtlineare Effekte ausgenutzt werden.

Verfahren, die nichtlineare optische Effekte ausnutzen, konnten bisher keine große Auflösungserhöhung demonstrieren. Dies hängt auch damit zusammen, daß man mit entsprechend längeren Wellenlängen arbeiten muß, um Mehrphotonen Übergänge zu erreichen. Außerdem ist der Übertragungseffizienz bei hohen Raumfrequenzen im allgemeinen sehr schlecht, weil üblicherweise nur ein sehr kleiner Teil der Beleuchtungsintensität hohe Raumfrequenzen enthält.

3 Ziel

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zu schaffen, das es ermöglicht, eine hohe Auflösung in optisch Abbildenden Systemen zu erzielen. Ein weiteres Ziel ist es bekannte mikroskopische Verfahren unter Beibehaltung ihrer jeweiligen Vorteile so zu erweitern, daß deren Auflösung zusätzlich gesteigert wird.

Diese Aufgabe wird durch Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.



3.1 Genauere Erläuterung des Verfahrens

In Anspruch 1 wird ein allgemeines Verfahren beschrieben, daß es ermöglicht den effektiven Bereich von detektierbaren Raumfrequenzen des Objekts $F(Obj(\vec{x}))$ (Objekt-Raumfrequenzen) beträchtlich zu erweitern. Dabei wird ausgenutzt, daß unter gewissen Bedingungen die Formel 1 verallgemeinert werden muß zu

$$PSF(\vec{x}) \otimes I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})) \quad (2)$$

$$\Leftrightarrow OTF(\vec{k}) \cdot F(I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x}))) \quad (3)$$

Es wird also kein linearer Zusammenhang mehr vorausgesetzt zwischen der von einem Objektpunkt ausgehenden Lichtintensität $I_{em}(\vec{x})$ und der dort eingestrahlten Lichtintensität (enthalten in $\vec{b}(\vec{x})$). Vielmehr ist nun $I_{em}(\vec{x})$ eine allgemeine Funktion von der Dichte der zu untersuchenden Objekteigenschaft und anderen Faktoren $\vec{b}(\vec{x})$, die im Folgenden als nichtlineare Bedingungen bezeichnet werden. Der Vektorpfeil über \vec{b} soll andeuten, daß es sich um mehrere Bedingungen b_i handeln kann. Ein wichtiger dieser Faktoren ist nach wie vor die eingestrahlte Lichtintensität an diesem Ort $Bel(\vec{x})$. Man kann nun $I_{em}(\vec{x})$ als Taylorreihe mit konstanten Koeffizienten c_i nähern:

$$\begin{aligned} I_{em}(\vec{x}) \cong & c_0 + c_1 \cdot Obj(\vec{x}) + c_2 \cdot b_1(\vec{x}) + c_3 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x}) \\ & + c_4 \cdot Obj(\vec{x})^2 \cdot b_1(\vec{x}) + c_5 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x})^2 + \dots \\ & + c_6 \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x})^3 + \dots \end{aligned} \quad (4)$$

der Einfachheit halber wurde hier nur eine nichtlineare Bedingung $b_1(\vec{x})$ berücksichtigt. Sind noch andere solche Bedingungen in den Prozeß der Aussendung von Licht von diesem Punkt involviert, so treten natürlich die entsprechenden Terme auch in dieser Entwicklung auf (insbesondere auch Mischterme wie $c_{5b} \cdot Obj(\vec{x}) \cdot b_1(\vec{x}) \cdot b_2(\vec{x})$). Der Term hinter c_3 ist gerade der in Formel 1 genannte, wenn man als nichtlineare Bedingung $b_1(\vec{x}) = Bel(\vec{x})$ annimmt. Die Fouriertransformierte der ausgesandten Lichtintensität $F(I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})))$ enthält demnach analog zu Formel 1 den Term $c_3 \cdot F(Bel(\vec{x})) \otimes F(Obj(\vec{x}))$.

Man kann sich nun $F(Bel(\vec{x}))$ in eine Summe einzelner δ -Funktionen zerlegt denken. Je nach Beleuchtungsmuster werden also Teile der Fouriertransformierten Objektfunktion durch die Faltung mit der Fouriertransformierten Beleuchtungsfunktion verschoben und mit entsprechendem Gewicht aufaddiert (siehe Abbildung 1). Aus dieser Summe wird durch die optische Abbildung (die folgende Multiplikation mit der raumfrequenzbegrenzten $OTF(\vec{k})$) gewissermaßen der detektierbare Bereich „ausgestanzt“. Der Bereich detektierbarer Objekt-Raumfrequenzen ist bei Beleuchtung mit einem Muster dadurch schon deutlich gegenüber dem Fall einer gleichmäßigen Beleuchtung erweitert. Mit entsprechenden Rekonstruktionsverfahren lassen sich die verschobenen Objekt-Raumfrequenzen wieder zu einem konsistenten Bild zusammensetzen (siehe [4]).

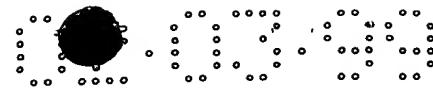
Außerdem treten jetzt aber auch Terme höherer Ordnung in $b_1(\vec{x})$ auf, wie hinter c_5 und c_6 in Formel 4. Deren Fouriertransformierte sind dann auch in $F(I_{em}(Obj(\vec{x}), \vec{b}(\vec{x})))$ enthalten. Wenn also $b_1(\vec{x}) = Bel(\vec{x})$ erhält man in Formel 2 auch den Term: $c_5 \cdot [F(Bel(\vec{x})) \otimes F(Bel(\vec{x}))] \otimes F(Obj(\vec{x}))$. Mit einem gewissen Anteil im Bild ist es jetzt möglich Raumfrequenzen des Objekts zu messen, die vorher nicht zugänglich waren, da sie durch die Faltung mit der raumfrequenzbegrenzten Funktion $F(Bel(\vec{x}))$ noch nicht in den mittels $OTF(\vec{k})$ detektierbaren Bereich geschoben werden konnten. Die Ausdehnung des Trägers von $F(Bel(\vec{x})) \otimes F(Bel(\vec{x}))$ kann nun aber entsprechend größer sein, wodurch sich entsprechend höhere Raumfrequenzen in den durch $OTF(\vec{k})$ detektierbaren Bereich schieben und so im Bild messbar sind. Noch höhere Ordnungen wirken sich entsprechend in weiteren Faltungen mit den Fouriertransformierten der $b_i(\vec{x})$ aus, so daß entsprechend noch höhere Objekt-Raumfrequenzen detektierbar sind. Im Prinzip ist es damit möglich beliebig hohe Raumfrequenzen des Objekts zu detektieren und somit die Auflösung beliebig zu erhöhen, wenn entsprechende Koeffizienten in der Reihenentwicklung 4 vorhanden sind. In den meisten Fällen wird die bei Rekonstruktion erzielbare praktische Auflösung aber oft durch das bei diesen hohen Objekt-Raumfrequenzen erreichbare Signal zu Rausch Verhältnis begrenzt.

3.2 Rekonstruktion aus Meßdaten

Hat man Daten gemessen, welche die gewünschten Objekt-Raumfrequenzen enthalten ist es sinnvoll diese zu einem konsistenten Bild zusammenzusetzen. Dazu muß es allerdings möglich sein die Funktionen $b_i(\vec{x})$ vom der das Objekt beschreibenden Funktion $Obj(\vec{x})$ zu unterscheiden. Das bedeutet, daß man diese am Punkte \vec{x} variieren muß. Dies kann auf unterschiedliche Arten geschehen. Eine Möglichkeit ist es $b_i(\vec{x})$ als ein räumliches Muster auszubilden, daß dann gegenüber dem Objekt zwischen unterschiedlichen Einzelbildern verschoben wird. Des weiteren kann man aber z.B. auch die Stärke dieses Musters oder dessen Form zwischen der Aufnahme von Einzelbildern verändern, wodurch die in der Taylorentwicklung 4 gezeigten Komponenten auch unterscheidbar werden.

Eine Rekonstruktion eines hochauflösenden Bildes kann nun auf verschiedene Arten geschehen. In einer direkten Variante werden die in der oben gezeigten Taylorentwicklung enthaltenen Terme, so weit sie messbaren Einfluß haben, durch das Lösen eines Gleichungssystems ermittelt und so voneinander getrennt. Die Multiplikation mit der OTF verhindert nicht, daß es möglich ist an jedem Punkt im Bereich des Trägers der OTF im reziproken Raum dieses Gleichungssystems zu bestimmen und im Prinzip zu lösen. Durch Verschiebung im Fourierraum (oder Multiplikation mit $\exp(i\vec{\Delta k}\vec{x})$ im Ortsraum mit Frequenzraum-Verschiebevektor $\vec{\Delta k}$) können die individuellen Komponenten dann so zusammengesetzt werden, daß sich ein hochauflösendes Bild ergibt. Dieses kann dann mit weiteren Dekonvolutionstechniken verarbeitet werden um die Qualität des Bildes weiter zu steigern.

Beleuchtung mit einem Muster aus möglichst hohen Raumfrequenzen ermöglicht eine große Auflösungserhöhung gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie (siehe auch Patent



US 5671085). Durch Ausnutzung eines nichtlinearen Zusammenhangs zwischen der Stärke eines Musters an einem Objektpunkt und der von diesem Objektpunkt ausgehenden (emmitierten bzw. gestreuten) Lichtintensität, ist es möglich ein Bild mit noch höherer Ortsauflösung zu berechnen. Als Beispiel lässt sich dieses Muster durch Anregung von Fluoreszenz mit einer ortsabhängigen Verteilung intensivem Lichts erzeugen. Die nichtlineare Abhängigkeit kann dann z.B. durch die Sättigung der Anregung von im Objekt vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffen entstehen. Ist dabei das eingestrahlte Licht intensiv genug, erhält man einen nichtlinearen Zusammenhang der an einem Punkt emmitierten Lichtintensität von der an diesem Punkt eingestrahlten Lichtintensität (siehe [11] und [13]). Das detektierte Licht enthält nun auch Information über Raumfrequenzen des Objekts, die sonst nicht zugänglich wären. Allerdings enthält jedes so aufgenommene Bild eine Mischung von Anteilen hoher Raumfrequenzen, die aber dann durch Aufnahme unter unterschiedlichen Bedingungen und Verrechnung mehrerer solcher Bilder getrennt und zu einem konsistenten hochauflösenden Bild zusammengesetzt werden können.

Um z.B. im Fall der Fluoreszenzmikroskopie bei Beleuchtung mit einer einem Liniengitter ähnlichen Struktur ein Bild zu rekonstruieren, kommt man wie folgt zu einem Gleichungssystem:

Die Intensitätsverteilung des anregenden Lichts lasse sich in diesem Beispiel durch eine in den positiven Bereich verschobene Sinusfunktion beschreiben. Als Fouriertransformierte ergeben sich dann drei im Idealfall punktförmige Maxima bei $\vec{k} = 0$, $\vec{k} = +\vec{k}_b$ und $\vec{k} = -\vec{k}_b$ (Abbildung 1). Diese Maxima haben je nach Modulationsgrad eine Intensität und einen jeweiligen Phasenwinkel in der komplexen Ebene, der von der Verschiebung diese Musters abhängt. Durch den Einfluß der nichtlinearen Abhängigkeit der Emissionsintensität von der Beleuchtungsintensität (Sättigung der Fluoreszenz) ergibt sich ein Muster der Anregbarkeit von Fluoreszenz eines bestimmten Farbstoffes, welches aus im Prinzip unendlich vielen Maxima im reziproken Raum besteht, deren absolute Höhe aber mit steigendem \vec{k} schnell abnimmt (siehe Abbildung 2). Näherungsweise kann man Rekonstruktionen bei einem endlichen Raumfrequenzwert $\vec{k}_{max} = \pm m \vec{k}_b$ abbrechen und in der Rechnung nur Maxima mit kleineren Raumfrequenzen berücksichtigen. Verschiebt man dieses Anregbarkeitsmuster gegenüber dem Objekt, so ändern sich die jeweiligen komplexen Phasenlagen der einzelnen punktförmigen Anregungs-Maxima im Fourierraum. Berücksichtigt man $\pm m$ Anregungs-Maxima (und das bei $\vec{k} = 0$) benötigt man also $2m + 1$ unter verschiedenen Bedingungen aufgenommene Bilder um die einzelnen abgebildeten Komponenten, welche mit dem jeweiligen Maximum gefaltet (also verschoben) sind separieren zu können. Als Beispiel sei hier $m = 2$. Der Phasenwinkel der Maxima im Frequenzraum des Anregbarkeitsmusters bewegt sich bei Verschiebung des Anregbarkeitsmusters proportional zu $n \vec{k}_b$, da eine Verschiebung im Raum um $\Delta \vec{x}$ einer Multiplikation im Frequenzraum mit $\exp(i \vec{k} \Delta \vec{x})$ entspricht. Nimmt man also verschiedene Bilder $I_n(\vec{k}) = F(I_n(\vec{x}))$ des Objekts mit jeweils um ein Fünftel des Grundmusters gegeneinander verschobener Phaselage des Beleuchtungsmusters (also auch des Anregbarkeitsmusters) auf, so ergibt sich folgendes

02 · 03 · 09

Gleichungssystem:

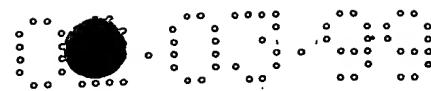
$$M \cdot \begin{pmatrix} Obj_0(\vec{k}) \\ Obj_1(\vec{k}) \\ Obj_{-1}(\vec{k}) \\ Obj_{+2}(\vec{k}) \\ Obj_{-2}(\vec{k}) \end{pmatrix} = const \cdot \begin{pmatrix} I_0(\vec{k}) \\ I_1(\vec{k}) \\ I_2(\vec{k}) \\ I_3(\vec{k}) \\ I_4(\vec{k}) \end{pmatrix}$$

$$M = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & exp(i2\pi/5) & exp(-i2\pi/5) & exp(i4\pi/5) & exp(-i4\pi/5) \\ 1 & exp(i4\pi/5) & exp(-i4\pi/5) & exp(i8\pi/5) & exp(-i8\pi/5) \\ 1 & exp(i6\pi/5) & exp(-i6\pi/5) & exp(i12\pi/5) & exp(-i12\pi/5) \\ 1 & exp(i8\pi/5) & exp(-i8\pi/5) & exp(i16\pi/5) & exp(-i16\pi/5) \end{bmatrix}$$

$Obj_n(\vec{k})$ bezeichnen hier die zum n . Maximum des Anregungsmusters gehörenden, verschobenen komplexwertigen Komponenten des fouriertransformierten Objekts (Objekt-Raumfrequenzen), welche dann durch die OTF des abbildenden Systems transmittiert wurden. Durch Lösung dieses Gleichungssystems können die individuellen Objektkomponenten, die zu jedem Maximum des Anregbarkeitsmusters gehören ermittelt werden. Dies kann z.B. durch Invertieren der Matrix M geschehen. Diese Inverse (M^{-1}) kann dann mit dem rechts stehenden Vektor der gemessenen Intensität $I_n(\vec{k})$ multipliziert werden, um die individuellen transmittierten Objektkomponenten zu ermitteln. Die Rechnung kann aufgrund der Linearität der Fouriertransformation auch pixelweise im Realraum ausgeführt werden. Die komplexwertigen Komponenten $Obj_n(\vec{k})$ können nun (z.B. durch Multiplikation im Realraum mit $exp(i\vec{\Delta k} \cdot \vec{x})$) um den Vektor $\vec{\Delta k}$ im Fourierraum verschoben werden, so daß die jeweilige Raumfrequenz \vec{k} dort zu liegen kommt, wo sie bei flacher, gleichmäßiger Beleuchtung gemessen würde. $\vec{\Delta k}$ ist also hier $n \vec{k}_b$. Die Komponenten $Obj_n(\vec{k})$ müssen noch in ihrer komplexen Phasenlage je nach gegenseitiger Phasenlage ϕ_n der Frequenzraum-Anregungsmaxima im Bild I_0 korrigiert werden (Multiplikation mit $exp(-i\phi_n)$) und können dann z.B. durch gewichtete Addition mit den anderen $Obj_n(\vec{k})$ zu einem konsistenten Bild vereinigt werden. Man erhält auf diese Weise eine Ausdehnung des Trägers (des von Null verschiedenen Bereichs) der gesamt-OTF auf einen deutlich größeren Bereich als es bei linearer Abbildung möglich wäre und somit eine entsprechende Auflösungserhöhung. Gleiches kann in verschiedenen Richtungen durchgeführt werden, was es so ermöglicht eine Auflösungserhöhung in ein, zwei oder drei Dimensionen zu erhalten. Die Gesamttransferfunktion kann im Anschluß daran oder bei Zwischenschritten noch durch entsprechendes Filtern und/oder Anwenden von Entfaltungstechniken verändert werden.

Auch ist es möglich ohne die beschriebene Matrix-Methode auszukommen, indem man z.B. Quadratur-Techniken anwendet (analog zu Patent WO 98/45745) oder algebraische/iterative Rekonstruktionsverfahren verwendet (maximum likelihood/expectation maximization, maximum entropie, algebraic reconstruction,..).

Analog zu obigem Verfahren lassen sich die Methoden anwenden auf beliebige Faktoren,



die imstande sind, für sich oder im Zusammenwirken untereinander (insbesondere zusammen mit der Beleuchtungsintensität) die Intensität des von Objekt ausgehenden Lichts zu beeinflussen.

4 Vorteile des neuen Verfahrens gegenüber anderen Verfahren

Das Verfahren lässt sich vergleichsweise einfach praktisch realisieren. Die Justierung einer solchen Apparatur beschränkt sich auf ein minimales Maß.

Vorteilhaft ist auch, daß hohe Raumfrequenzen, die in Objektiven stark unterdrückt werden, nun durch die Verschiebung im Frequenzraum effizienter detektiert werden können.

Außer einem lateralen Auflösungsgewinn erhält man zusätzlich auch einen axialen Auflösungsgewinn und die Möglichkeit, zur optischen Achse senkrecht stehende Ebenen in axialer Richtung zu diskriminieren (ähnlich wie beim konfokalen Mikroskop). Auch hier ergibt sich bei Ausnutzung der nichtlinearen Abhängigkeit die Möglichkeit zu einem beträchtlichen Auflösungsgewinn.

Das Verfahren ist in Kombination mit vielen anderen Mikroskopieverfahren oder Verfahren zur optischen Abbildung anwendbar (den oben genannten, Absorptionsmikroskopie, Reflexionsmikroskopie, Fluorescence Lifetime Imaging, Mehrphotonenmikroskopie, Interferenzmikroskopie, konfokale Mikroskopie, ...).

Die Bildgebung kann z.B. mit einer CCD-Kamera an allen Punkten in der Bildebene gleichzeitig geschehen und ist daher deutlich schneller möglich als bei abtastenden Verfahren.

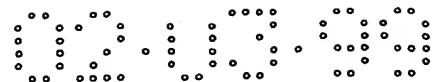
Die eingesetzten nichtlinearen Effekte (also z.B. Farbstoffsättigung) können auch dazu verwendet werden verschiedene Farbstoffe oder Farbstoffe in verschiedener Umgebung, die sonst schlecht von einander zu unterscheiden wären, auf Grund von unterscheidbaren nichtlinearen Eigenschaften zu trennen.

5 Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiele des Verfahrens sind in den Zeichnungen dargestellt und werden im folgenden näher beschrieben.

Es zeigen

- **Abbildung 3:** Eine beispielhafte Anwendung des Verfahrens auf die Epifluoreszenzmikroskopie.
- **Abbildung 4:** Eine beispielhafte Anwendung des Verfahrens auf die Epifluoreszenzmikroskopie bei seitlicher Beleuchtung.



- **Abbildung 5:** Simulationen von Mikroskopiebildern, als wenn sie mit dieser Technik aufgenommen wurden. Die Bilder wurden entsprechend einer in jedem Pixel poissonverteilten Photonenstatistik verrauscht. Die maximale Intensität betrug hierbei ca. 560 Photonen im Pixel in den jeweiligen Einzelbildern.
- **Abbildung 6:** Simulationen von aus diesen Bildern rekonstruierten hochauflösenden Bildern und der Vergleich mit simulierten normalen Epifluoreszenzbildern
- **Abbildung 7:** Vergleich der Intensitätskurven entlang einer Linie in 6d) und e).
- **Abbildung 9:** Vergleich zweier simulierter Rekonstruktionen mit einem elektronenmikroskopischen Bild des Zellkerns als angenommene „wahre“ Fluoreszenzdichte des Objekts.

In Abb. 3 ist ein Beispiel der Anwendung des Verfahrens auf die Epifluoreszenzmikroskopie zu sehen. Die ortsabhängig stark fluktuierende Beleuchtung wird erreicht durch Abbildung eines Beugungsgitters (1) (hier ein Transmissionsgitter, Gitterabstand z.B. $30 \mu\text{m}$) durch das Objektiv (2) auf das Objekt (3). Für die Aufnahme der unterschiedlichen Phasenlagen wird z.B. das Gitter in kleinen Schritten gegenüber dem Objekt unter dem Mikroskop verschoben. Die minimale Anzahl der nötigen Aufnahmen für das Rekonstruieren eines Bildes ergibt sich durch die Anzahl der Unbekannten des assoziierten Gleichungssystems (s.o.). Die Änderung der Phasenlage lässt sich z.B. auch erreichen, indem man das Objekt unter dem Mikroskop gegenüber der abgebildeten Beugungsstruktur verschiebt oder direkt die Phase der verschiedenen Beugungsmaxima durch geeignete optische Elemente beeinflusst wird.

Um die Auflösung in allen Raum-Richtungen zu erhöhen, ist es nötig, mit Mustern unter verschiedenen Winkeln nacheinander oder mit einem 2-dimensionalen Muster, welches Beugungsmaxima in mehreren Richtungen der Ebene hervorruft, in verschiedenen Phasenlagen in jeder Dimension zu beleuchten.

Durch Erstellen von Fokusserien kann man noch zusätzliche Information über die axiale Struktur und so dreidimensionale Bilder des Objekts gewinnen. Dies wird zum einen durch die inkohärente Lichtquelle zum anderen durch das Vorhandensein der 0. Beugungsordnung des Gitters noch zusätzlich erleichtert. Auch kann ein zusätzlicher Auflösungsgewinn durch Drehen des Objekts um eine auf der optischen Achse senkrecht stehende Achse unter dem abbildenden System erreicht werden.

Beleuchtet man mit **entsprechend starken momentanen Intensitäten**, so macht sich die Sättigung der Farbstoffe bemerkbar und führt zu den gewünschten nichtlinearen Effekten, die wesentlich zur Auflösungserhöhung beitragen. Als Lichtquellen bieten sich hier auch insbesondere intensive Blitzlicht-Lampen (aber auch Laser) an. Die gesuchten Anteile der sich überlagernden individuellen Ordnungen können aus den Bildern bei verschiedenen Phasenlagen der Anregungsstruktur errechnet werden. Es ist auch möglich, aus Aufnahmen mit verschiedener Beleuchtungsintensität hochauflösende Bilder zu rekonstruieren.



Unterdrückt man (z.B. durch Ausblenden) die 0. Beugungsordnung des Gitters (1), so erhöht man damit in vorteilhafter Weise den Modulationsgrad der Beleuchtungsfunktion und damit die relative Intensität in höheren Anregungsordnungen.

In einer anderen Anordnung wird die Probe mit Laserlicht beleuchtet. Man kann auf das Beugungsgitter verzichten und den aufgeweiteten Laserstrahl direkt über einen halbdurchlässigen Spiegel von zwei Seiten auf das Objektiv fallen lassen (nicht gezeigt). Es ist aber auch möglich, wie in Abb. 4 gezeigt, den Laserstrahl seitlich am Objektiv vorbei zu führen, wodurch noch höhere Beleuchtungsraumfrequenzen erzielt werden können. Die Anordnung gleicht in gewisser Weise einem Wellenfeldmikroskop, bei dem man nicht mit gegeneinander gerichtetem Licht beleuchtet und außerdem von der Seite detektiert. Um zusätzlich auch eine gute axiale Diskriminierung zu erhalten kann man den Strahl zugleich noch aus einer oder mehreren Richtungen durch das Objektiv (nicht gezeigt) und/oder von der dem Objektiv abgewandten Seite auf das Objekt fallen lassen (Abb. 4), welches sich in dem Interferenzbereich der Laserstrahlen (kreuzschraffierte Region) befindet. Die durch Nichtlinearitäten erzielbare zusätzliche Auflösungserhöhung kann man wiederum durch Benutzung entsprechend starker Laser bzw. gepulster Laser mit hohen **momentanen Intensitäten** erreichen. Auch die Verwendung anderer intensiver Lichtquellen (z.B. Blitzlichtlampen) ist denkbar und ggf. vorteilhaft.

Die Abbildungen 5 zeigen eine Serie von simulierten Einzelbildern bei einem zugrundeliegenden Fluoreszenzmikroskopieverfahren wie in Abb. 3 gezeigt. Intensität ist hier als Schwärzung dargestellt. Zur besseren Sichtbarmachung der Beleuchtung wurde im Objekt (Abb. 5 (a)) eine konstante Hintergrundfluoreszenz angenommen. In Abbildung 6 werden daraus rekonstruierte Bilder mit konventionell simulierten optischen Abbildungen verglichen. Es ist erkennbar, daß die Bildqualität des nichtlinearen Verfahrens selbst konventionellen Rekonstruktionen mit Hochfrequenzverstärkung deutlich überlegen ist.

Abb. 8 zeigt einen lateralen Schnitt durch die simulierte optische Transferfunktion des Gesamtsystems aus Abb. 3. Der Gitterabstand des Beugungsgitters wurde hier so gewählt, daß nur die Beugungsordnungen 0, +1 und -1 des Beugungsgitters durch das Objektiv übertragen werden können. Durch die teilweise **Sättigung der beteiligten Farbstoffe** ergibt sich eine nichtlineare Beziehung zwischen der Beleuchtungsintensität und der Wahrscheinlichkeit der Anregung eines Farbstoffmoleküls an einem Punkt im Objektraum. Diese räumlich variierende Anregungswahrscheinlichkeit wird hier Anregungsmuster genannt. Wenn man annimmt, daß die Anregungswahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Farbstoffmolekül eine Funktion der Beleuchtungsintensität ist, so führt eine Nichtlinearität dieser Funktion dazu, daß im Emissionsmuster auch räumlich höhere Harmonische des Anregungsmusters auftreten. Maxima im reziproken Raum, die jenseits der durch die Abbe-Grenze gegebenen Raumfrequenzbegrenzung liegen, können dann im Anregungsmuster auftreten. Die raumfrequenzbegrenzte Abbildung der Multiplikation der Farbstoffverteilung mit dem Anregungsmuster enthält nun Komponenten analog zu einer linearen Anregung mit einem Muster, welches höhere Raumfrequenzen enthält.

6 Begriffsdefinitionen und Erläuterungen

Im Folgenden sind für die Patentansprüche wichtige Begriffe näher ausgeführt und definiert:

Objektbedingungen: Darunter sind alle Parameter und Bedingungen am Ort des Objektes zu verstehen, die imstande sind, eine oder mehrere Eigenschaften (wie Intensität, Polarisationszustand, Phase, Farbe, Pulsform/-länge, Kohärenzgrad, Photonenkorrelation, ...) des Lichts, daß von Objekt ausgeht zu beeinflussen.

nichtlineare Abhängigkeit: Damit ist gemeint, daß die im Detektor detektierte Lichtintensität in ihrer Abhängigkeit von dem Wert einer Objektbedingung am Ort der Lichtaussendung (auch Streuung usw.) meßbar keinem einfachen linearen Modell folgt, also daß Terme höherer Ordnung in der obigen Taylorentwicklung (Formel 4) auftreten. Es genügt aber auch, daß z.B. eine lineare Abhängigkeit der Lichtintensität von mehreren Objektbedingungen zugleich vorliegt, da dann entsprechende „Mischterme“ in der Taylorentwicklung auftreten, welche auch zu einer Erweiterung der detektierbaren Objekt-Raumfrequenzen führen.

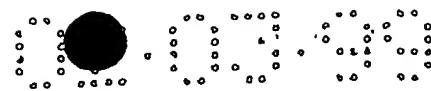
detektierte Lichtintensität: Die Lichtintensität, die mit dem Detektorsystem gemessen wird. Sie kann entsprechend der Funktionalität des Detektors von der am Ort des Detektors herrschenden mittleren Lichtintensität durchaus abweichen, wenn z.B. zeitlich moduliert detektiert wird oder ein rohes Detektorsignal mit anderen Signalen korreliert wird (z.B. durch Lock-In-Technik).

Einzelbild: Darunter sind allgemein mit einem im weitesten Sinne abbildenden lichtoptischen Verfahren aufgenommene Bilddaten zu verstehen. Es kann sich dabei um einen einzelnen Datenpunkt, mehrere an ein oder verschiedenen Objektpunkten aufgenommene Datenpunkte oder -bereiche in ein-, zwei-, drei- oder mehr Dimensionen handeln. Insbesondere ist es für untenstehende Patentansprüche völlig unerheblich, ob die Objektbedingungen bei jedem Datenpunkt geändert oder moduliert werden, oder ob dies erst nach Abschnitten oder ganzen zwei- oder dreidimensionalen Bildern oder sogar Zeitserien geschieht.

räumliches Muster: Darunter ist zu verstehen, daß der Wert der Objektbedingung eine räumliche Struktur besitzt also abhängig vom Ort im Objektraum ist.

detektierbare Raumfrequenzanteile: Darunter sind die Anteile des Frequenzraums der Fouriertransformierten des Objekts zu verstehen, die mit dem zugrundeliegenden abbildenden Verfahren prinzipiell detektiert werden können.

Informationen über das Objekt: Hierunter soll insbesondere die räumliche Verteilung einer oder mehrere Eigenschaften des Objekts zu verstehen sein, aber auch andere Parameter, wie z.B. die Position eines von seiner Struktur her bekannten Teilobjekts im Raum oder die Zusammensetzung des Objekts.

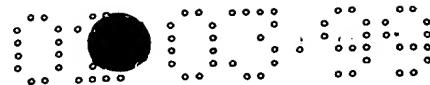


Literatur

- [1] M. Gustafsson, J. Sedat, and D. Agard. Method and apparatus for three-dimensional microscopy with enhanced depth resolution. US-Patent Number 5,671,085, September 23. 1997. I5M Microscope.
- [2] M.G.L. Gustafsson, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 3d widefield microscopy with two objective lenses: Experimental verification of improved axial resolution. *Proceedings of the SPIE*, 2655:62, 1996.
- [3] P. Hänninen and S. Hell. Luminescence-scanning microscopy process and a luminescence scanning microscope utilizing picosecond or greater pulse lasers. US-Patent Number 5,777,732, July 7. 1998. foreign priority Apr. 28, 1994 [DE] 44 14 940.9.
- [4] R. Heintzmann and C. Cremer. Lateral modulated excitation microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proceedings of the SPIE*, 3568:185-196, 1999.
- [5] S.W. Hell and M. Kroug. Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Applied Physics B*, 60:495-497, 1995.
- [6] K. Ichie. Laser scanning optical system and laser scanning optical apparatus. US-Patent Number 5,796,112, August 18. 1998. foreign priority Jun 3. 1993 Japan 5-13365, Assignee: Hammamatsu Photonics K.K.
- [7] R. Juskaitis, T. Wilson, M.A.A. Neil, and M. Kozubek. Efficient real-time confocal microscopy with white light sources. *Nature*, 383:804-806, 1996.
- [8] F. Lanni, B. Bailey, D.L. Farkas, and D.L. Taylor. Excitation field synthesis as a means for obtaining enhanced axial resolution in fluorescence microscopes. *Bioimaging*, 1:187-196, 1993.
- [9] F. Lanni, D.L. Taylor, and B. Bailey. Field synthesis and optical subsectioning for standing wave microscopy. US-Patent Number 5,801,881, September 1. 1998. Scanning Wavefield Microscope.
- [10] S. Lindek, E.H.K. Stelzer, and S. Hell. Two new high-resolution confocal fluorescence microscopies (4pi, theta) with one- and two-photon excitation. In James B. Pawley, editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, chapter 26, pages 417-429. Plenum Press, New York, second edition, 1995.
- [11] David R. Sandison, Rebecca M. Williams, K. Sam Wells, James Strickler, and Watt W. Webb. *Quantitative Fluorescence Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*, chapter 3, pages 47-50. Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York and London, second edition, 1995. Saturation of Fluorescence.

00-00-00

- [12] E.H.K. Stelzer and S. Lindek. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy. *Opt. Commun.*, 111:536–547, 1994.
- [13] Roger Y. Tsien and Alan Waggoner. *Fluorophores for Confocal Microscopy*, chapter 16, pages 267–268. Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York and London, second edition, 1995. Saturation of Fluorescence.
- [14] T. Wilson, R. Juskaitis, and M.A.A. Neil. A new approach to three dimensional imaging in microscopy. *Cell Vision*, 4(2):231, March 1997.
- [15] T. Wilson, R. Juskaitis, M.A.A. Neil, and M. Kozubek. An aperture correlation approach to confocal microscopy. *Proceedings of the SPIE*, 2984:21–23, 1997.
- [16] R. Windecker, M. Fleischer, and H. Tiziani. Three-dimensional topometry with stereo microscopes. *Optical Engineering*, 36(12):3372–3377, December 1997.

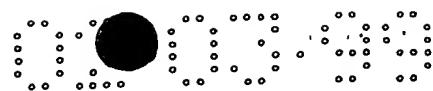


7 Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung der Auflösung optischer Abbildung eines oder mehrerer Objekte (im Folgenden mit *Objekt* bezeichnet) mit folgenden Schritten:
 - (a) Anpassung der im Objekt herrschenden Bedingungen, die das von einem Objektpunkt ausgehende Licht zu beeinflussen imstande sind, (*Objektbedingungen* $b_i(\vec{x})$ = Beleuchtungsintensität und/oder zusätzliche Effekte) derart, daß eine *nichtlineare Abhängigkeit* der von einem Objektpunkt detektierten Lichtintensität von dem Wert eines in mindestens einer Objektbedingung enthaltenen *räumlichen Musters* in mindestens einem detektierten Wert hervorgerufen wird oder eine jeweils zu einem Wert lineare Abhängigkeit der von diesem Objektpunkt detektierten Lichtintensität von der Werten mindestens zweier räumlicher Muster $b_i(\vec{x})$ hervorgerufen wird.
 - (b) Aufzeichnung wenigstens eines *Einzelbildes* unter diesen Objektbedingungen.
 - (c) Ändern der Objektbedingungen derart, daß unterschiedliche durch das Aufnahmeverfahren abgebildete Raumfrequenzanteile des Objekts (*detektierbare Raumfrequenzanteile*) sich in ihrer Amplituden und/oder Phasenbeziehung zueinander verändern.
 - (d) Aufzeichnung wenigstens eines weiteren Einzelbildes unter jeweils gemäß (c) veränderten Objektbedingungen.
 - (e) Auswertung der gemessenen Bilder, indem die sich in den Einzelbildern unterschiedlich ausprägenden Objektbedingungen genutzt werden um *Informationen über das Objekt* zurückzugewinnen, die zu Raumfrequenzen des Objekts gehören, welche durch eine einfache Abbildung mit dem Aufnahmeverfahren nicht zugänglich wären.
2. Verfahren in dem das räumliche Muster durch ein Muster der Beleuchtungsintensität gegeben wird.
3. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die Abbildung mittels einem bekanntem optischen Mikroskopieverfahren geschieht; insbesondere mittels Standard Fernfeld Mikroskopie, Epi-Fluoreszenz-Mikroskopie, konfokaler Mikroskopie, 4PI-Mikroskopie, I^2M -, I^3M -, I^5M -Verfahren, Theta-Mikroskopie, Nahfeld-Mikroskopie.
4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß eine *nichtlineare Abhängigkeit* der im Detektor (oder den Detektoren) von einem Objektpunkt detektierten Lichtintensität zu der an diesem Punkt herrschenden *Beleuchtungsintensität* (nicht notwendigerweise bei der selben Frequenz des Lichts) ausgenutzt wird.

00-00-00

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet daß zur Erzeugung nichtlinearer Effekte nötige momentane Lichtintensitäten dadurch erzeugt werden, daß eine gepulste Beleuchtungsquelle, insbesondere ein Pulslaser oder eine Blitzlampe, verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 5, dadurch gekennzeichnet daß die Sättigung des Fluoreszenzlichts von Fluorophoren unter intensiver Beleuchtung ausgenutzt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet daß die Sättigung der Absorption von Beleuchtungslicht unter intensiver Beleuchtung ausgenutzt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet daß eine Abhängigkeit der Phase des emittierten oder gestreuten Lichts von der im Objekt vorhandenen Beleuchtungsintensität ausgenutzt wird, welche sich im Detektor (zum Beispiel über Interferenz) oder davor in eine nichtlineare Intensitätsabhängigkeit umsetzt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet daß Die Abhängigkeit der Intensität der Ramanstreuung von dem Wert einer oder mehrerer Objektbedingungen ausgenutzt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet daß zeitlich kohärente Effekte (zum Beispiel Rabi-Oszillationen) an Atomen oder Molekülen (auch Fluorophore) im Objekt (in Lösung, Festkörpern, Gasen oder auch im Vakuum) gezielt ausgenutzt werden, um die benötigte nichtlineare Abhängigkeit zu erzeugen. Die Induktion solcher Effekte kann dabei insbesondere durch Beleuchtung mit sehr kurzen Pulsen geschehen.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet daß die nichtlineare Abhängigkeit des emittierten Lichts von der im Objekt vorhandenen Lichtintensität bei Mehrphotonen-Absorption ausgenutzt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 11, dadurch gekennzeichnet daß Anregung und darauf folgende stimulierte Emission eine nichtlineare Abhängigkeit von detektiertem Licht und am Objektpunkt vorhandener Lichtintensität entsteht. Die stimulierte Emission kann gleichzeitig oder in zeitlicher Abfolge induziert werden. Sie kann bei der selben Wellenlänge (z.B. auch durch das Anregungslicht) oder bei einer anderen Wellenlänge (z.B. der Fluoreszenzwellenlänge) induziert werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 12, dadurch gekennzeichnet daß Fluorophore durch Licht gleichzeitig oder vor der Beleuchtung in andere Zustände (z.B. Tripplet-Zustand oder auch chemisch veränderte Zustände) versetzt werden und

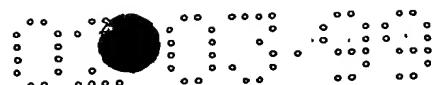


sich daraus eine nichtlineare Abhängigkeit des emittierten Lichts von der am Objekt-
punkt vorhandenen Intensität ergibt. Dies kann automatisch mit der Beleuchtung
geschehen oder auch durch Beleuchtung mit anderen Wellenlängen.

14. Verfahren nach einem der Ansprue 4 bis 13, dadurch gekennzeichnet daß
Energie durch Strahlung oder strahlungslose Prozesse von Fluorophoren auf benach-
barte andere Fluorophor-Moleküle übertragen wird und dadurch eine nichtlineare
Abhängigkeit der emittierten Lichtintensität von der am Nachbarort eingestrahlten
Intensität entsteht.
15. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
eine nichtlineare Abhängigkeit des von einem Objektpunkt detektierten Lichts von
einem räumlich inhomogenen elektrischen Feld ausgenutzt wird.
16. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
eine nichtlineare Abhängigkeit des von einem Objektpunkt detektierten Lichts von
einem räumlich inhomogenen angelegten magnetischen Feld ausgenutzt wird.
17. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
eine nichtlineare Abhängigkeit des von einem Objektpunkt detektierten Lichts von
dem im Objektpunkt herrschenden Druck ausgenutzt wird.
18. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
eine nichtlineare Abhängigkeit des von einem Objektpunkt detektierten Lichts von
den im Objektpunkt herrschenden Scherkräften oder mechanischen Spannungsver-
hältnissen ausgenutzt wird.
19. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
eine nichtlineare Abhängigkeit des von einem Objektpunkt detektierten Lichts von
der im Objektpunkt herrschenden Temperatur ausgenutzt wird.
20. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
eine nichtlineare Abhängigkeit des vom Objektpunkt detektierten Lichts von dort
herrschenden chemischen Bedingungen (z.B. Ph-Wert) ausgenutzt wird.
21. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
eine nichtlineare Abhängigkeit des von einem Objektpunkt detektierten Lichts von
der Intensität eingestrahlter Radiowellen oder Mikrowellen oder Infrarotlicht oder
Roentgenstrahlung oder Schallwellen oder Ultraschallwellen ausgenutzt wird.
22. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprue, dadurch gekennzeichnet daß
das räumliche Muster einer Objektbedingung beschrieben oder annähernd beschrie-
ben werden kann durch eine Anzahl von Punkten im reziproken Raum verteilt in 1,2
oder 3 Dimensionen.

000 · 111 · 000

23. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das räumliche Muster räumlich periodisch (oder näherungsweise periodisch) in einer oder mehreren Dimensionen ist.
24. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß ein ausgedehntes räumliches Muster erzeugt wird und Licht gleichzeitig (z.B. mit einer CCD-Kamera) von vielen Objektpunkten detektiert wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet daß das räumliche Muster an ein oder mehreren Stellen möglichst fokussiert ist (Wie z.B. im konfokalen Mikroskop oder im 4Pi-Mikroskop) und Objekt und Muster für verschiedene Einzelbilder zueinander verschoben werden.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet daß versucht wird den Emissionsort des detektierten Lichts auf einem dem räumlichen Muster nach Anspruch 25 ähnlichen Verteilung einzuschränken (z.B. durch Einfügen einer oder mehrerer Lochblenden vor dem Detektor).
27. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das räumliche Muster erzeugt wird durch **Abbildung** einer geeigneten Vorlage, die zwischen den Einzeldaten ausgetauscht oder gezielt verändert wird (zum Beispiel analog zur „Aperture Correlation Microscopy“).
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet daß die Abbildung dieselben Elemente, die zur Detektion erforderlich sind ganz oder teilweise mit nutzt (z.B. Abbildung eines Intensitätsmusters durch das Objektiv, daß zur Detektion auch verwendet wird).
29. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das räumliche Muster erzeugt wird indem bewußt ganz oder zum Teil ein anderer Weg zur Erzeugung des Musters als die Benutzung der vorhandenen Detektionsmittel um eine zusätzliche Steigerung der Auflösung zu erreichen (z.B. Erzeugung eines Wellenfelds durch seitliche Beleuchtung am Objektiv vorbei oder analog zur Theta-mikroskopie mit anderen Objektiven).
30. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß Objekt und das räumliche Muster in ein oder in mehrere Richtungen oder Dimensionen relativ zu einander verschoben werden.
31. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das räumliche Muster zumindest auch dadurch verändert wird, daß Komponenten aus denen es sich (z.B. durch Interferenz) zusammensetzt in der Phase gegeneinander verschoben werden (zum Beispiel die Phase verschiedener Beugungsmaxima).
32. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß eine **zeitliche Struktur** der oder den nichtlinearen Bedingungen aufgeprägt wird



und Daten zu unterschiedlichen Zeiten aquiriert werden (zum Beispiel bei dann veränderter Einstrahlungs-Lichtintensität).

33. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das Zusammensetzen der Einzeldaten direkt dadurch geschieht, daß die individuellen Komponenten über das Lösen eines Gleichungssystems unter Berücksichtigung der verschiedenen nichtlinearen Bedingungen extrahiert werden und an den richtigen Stellen des Fourieraums plaziert (zum Beispiel gewichtet aufaddiert) werden. Die dazu notwendige Rechnung muß sich dazu nicht notwendigerweise auf den Fourierraum stützen. Eine Fouriertransformation ist dabei nicht unbedingt von Nöten.
34. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das Zusammensetzen der Einzeldaten ganz oder teilweise implizit dadurch geschieht, daß von der Nichtlinearität abhängenden unterschiedlichen Daten in einem iterativen Prozeß berücksichtigt werden.
35. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß das Verfahren durch Näherungen vereinfacht wird, das Gleichungssystem nur näherungsweise gelöst wird oder die Iterationen bereits nach wenigen Iterationen abgebrochen werden.
36. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß der iterative Prozeß auf Maximum-Likelihood Rekonstruktion oder anderen algebraischen Verfahren beruht.
37. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet daß nach dem Zusammensetzen der Daten ein weiteres rechnerisches Verfahren angewandt wird um die Auflösung zu erhöhen oder im Fourieraum entstehende Unstetigkeiten zu glätten oder die durch den Algorithmus entstehende effektive optische Transferfunktion beziehungsweise die effektive Punktbildfunktion geeignet zu formen (z.B. durch Unterdrückung oder Verstärkung gewisser Raumfrequenzen).
38. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß die vorhandene Information über die nichtlineare Abhängigkeit der von einem Objektpunkt detektierten Intensität von den nichtlinearen Bedingungen ausgenutzt wird um die Position ein oder mehrerer Teilobjekte möglichst genau zu bestimmen.
39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet daß zusätzlich die Struktur des Teilobjekts oder die Struktur seines Bildes genau oder näherungsweise bekannt ist und diese in dem Verfahren als bekannte Struktur (a priori oder als gemessene Struktur) berücksichtigt wird.
40. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß der Unterschiede in der nichtlinearen Abhängigkeit der von einem Objektpunkt detektierten Intensität von den nichtlinearen Bedingungen ausgenutzt werden um Auf-

02-11-09

schlüsse über die örtliche Zusammensetzung des Objekts an verschiedenen Positionen aus verschiedenen Materialien zu gewinnen.

41. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß der Unterschiede in der nichtlinearen Abhängigkeit der von einem Objektpunkt detektierten Intensität von den nichtlinearen Bedingungen gezielt ausgenutzt werden um Teilobjekte und deren Position bestimmen zu können, auch wenn sich deren Bilder zu einem großen Teil überlagern.

ÜC. 00-999

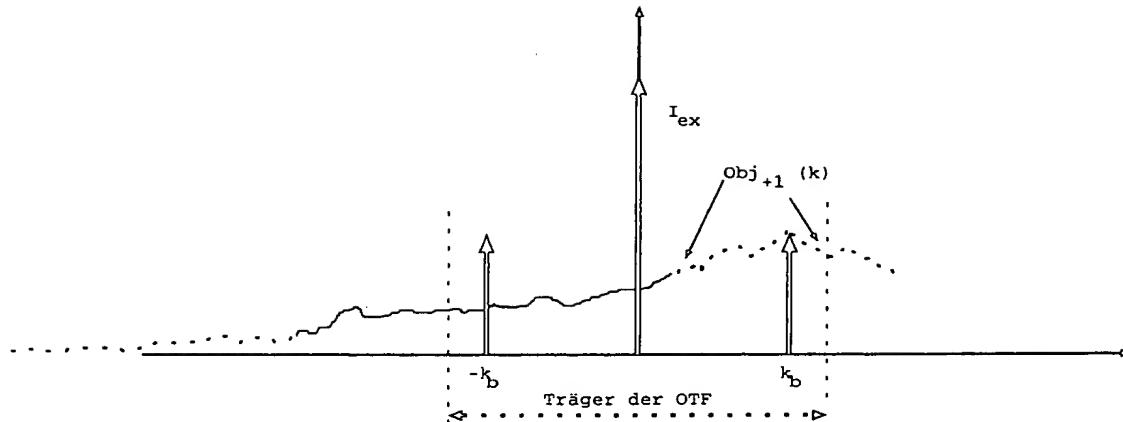


Abbildung 1: Struktur der Anregungsverteilung im reziproken Raum bei sinusförmiger Beleuchtung mit geringer Intensität. Die nach oben gerichteten Pfeile bezeichnen die Maxima die aus der sinusförmigen Anregung herrühren. Zusätzlich ist noch die an ein solches Maximum „gekoppelte“ Struktur der Fouriertransformierten der Objektfunktion eingezeichnet ($Obj_{+1}(k)$). Da $Obj(k)$ mit der Anregungsstruktur zu Falten ist $Obj(k)$ an jedes Maximum „gekoppelt“ (der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet). Nur der mittlere Teil an emittierten Raumfrequenzen (Träger der OTF) ist der Detektion zugänglich.

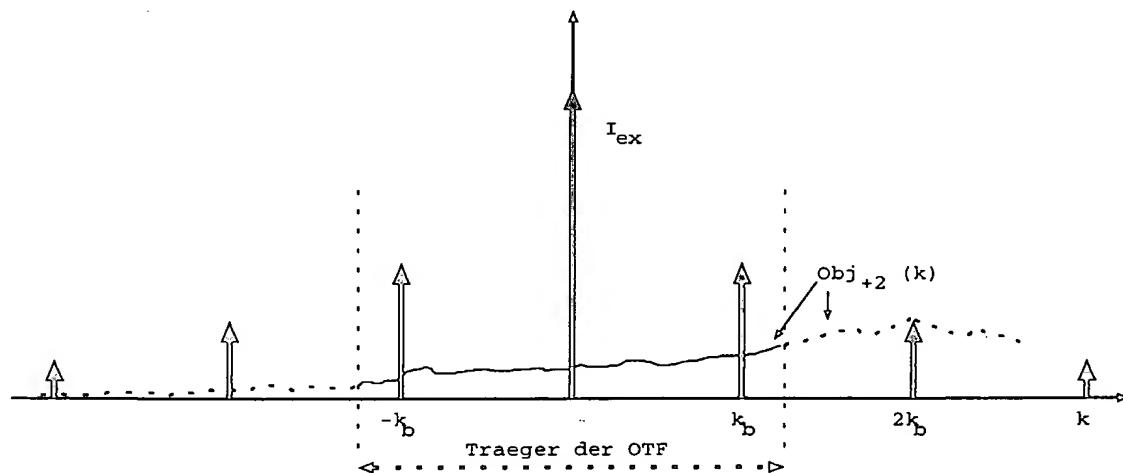


Abbildung 2: Struktur der Anregungsverteilung im reziproken Raum bei einem nichtlineär verzerrten Anregungsmuster. Die nach oben gerichteten Pfeile bezeichnen die Maxima die aus eines nichtlinear verzerrten sinusförmigen Anregung (z.B. durch Fluoreszenzsättigung) herrühren. Zusätzlich ist noch die an ein solches Maximum „gekoppelte“ Struktur der Fouriertransformierten der Objektfunktion eingezeichnet ($Obj_{+2}(k)$). $Obj(k)$ ist an jedes Maximum gekoppelt (nicht gezeigt) und überlagert sich mit verschobenen, skalierten und phasengedrehten Versionen von sich selbst. Nur der mittlere Teil an emittierten Raumfrequenzen (Träger der OTF) ist der Detektion zugänglich.

02.03.99

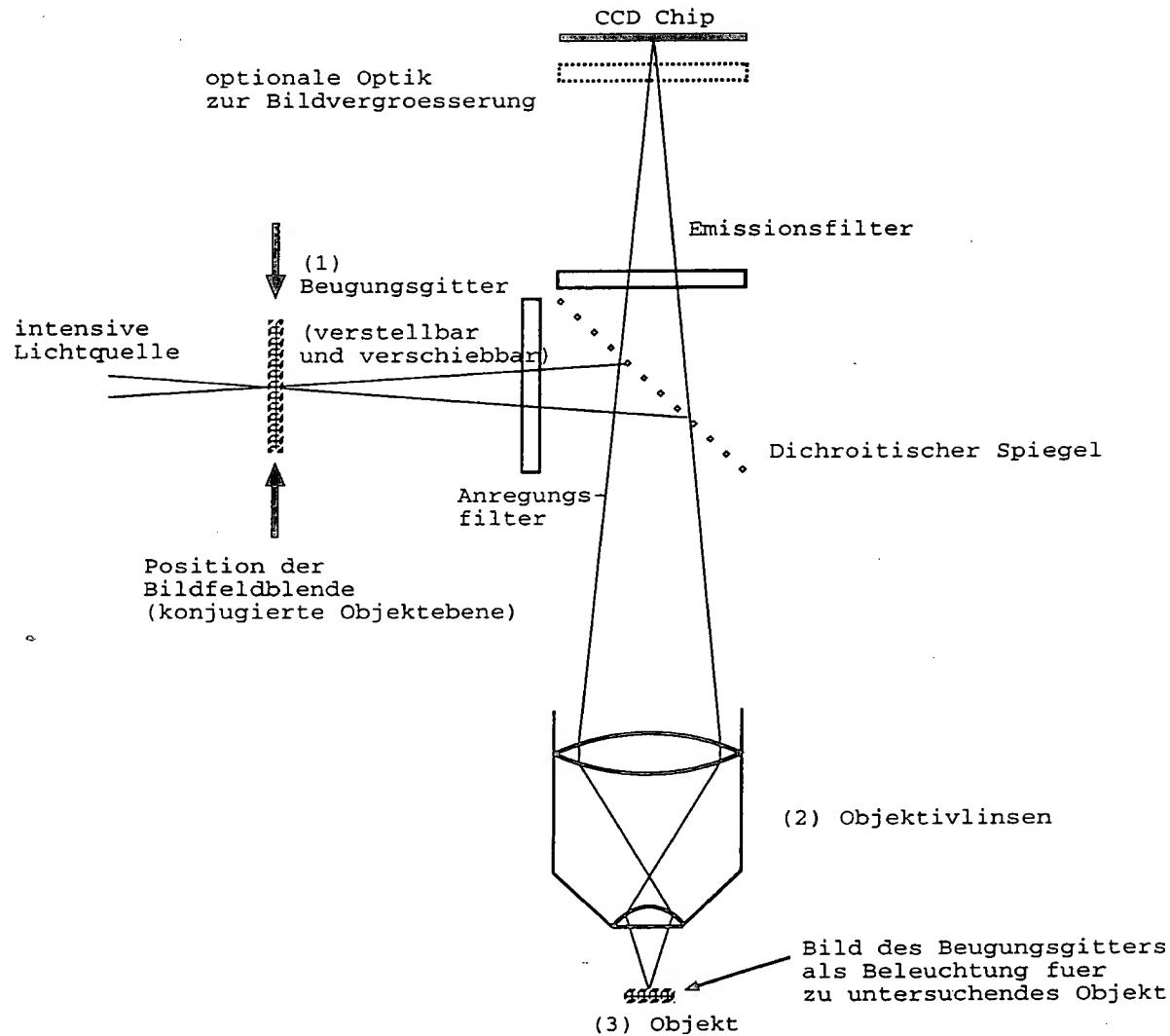


Abbildung 3: Eine beispielhafte Anwendung des Verfahrens auf die Epifluoreszenzmikroskopie. Beleuchtung kann zum Beispiel mit einer Quecksilberdampflampe/Blitzlichtlampe geschehen.

0003-99

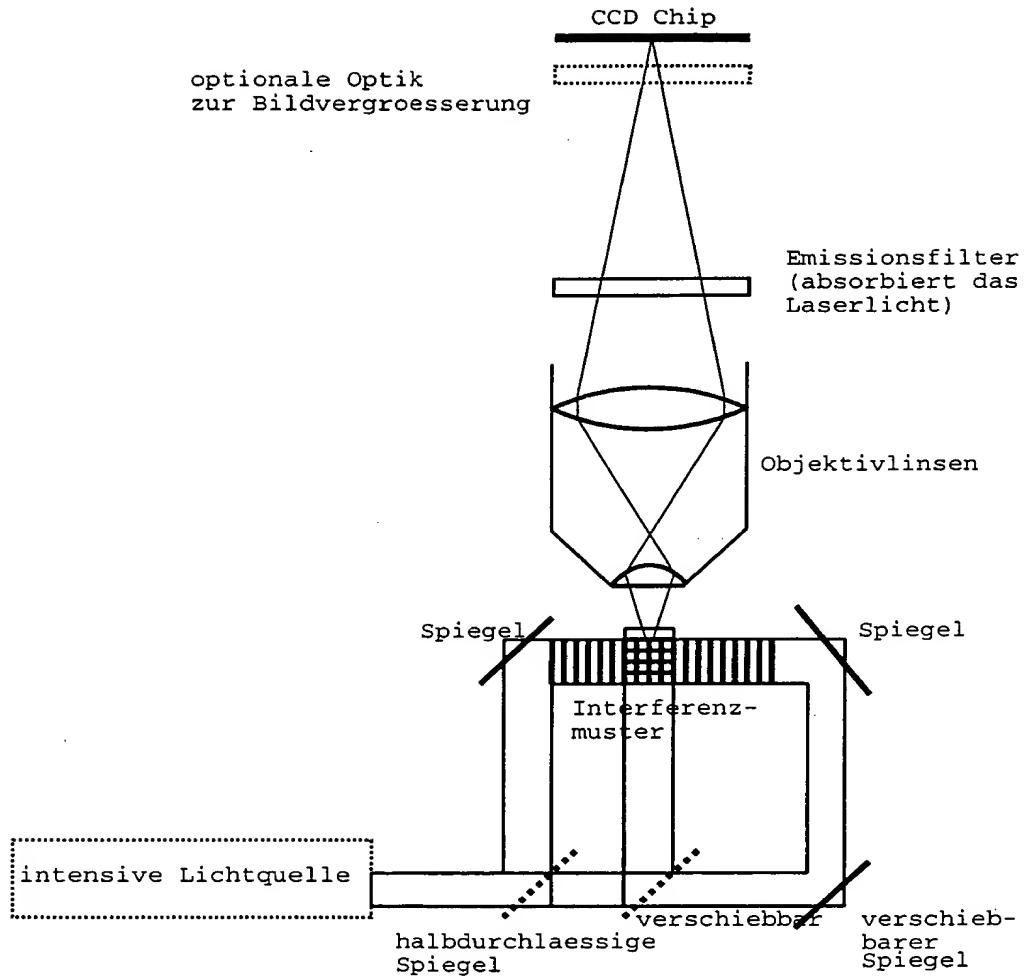


Abbildung 4: Eine schematische Darstellung der Anwendung des Verfahrens auf die 3D-Mikroskopie bei Beleuchtung durch drei miteinander interferierende Lichtstrahlen. Die Strahlen interferieren nur über einen Bereich, der in der Größenordnung der Kohärenzlänge der Lichtquelle liegt. Besonders geeignet scheint eine Beleuchtung mittels gepulster Laser, aber auch andere helle Lichtquellen sind denkbar.

02-03-99

30

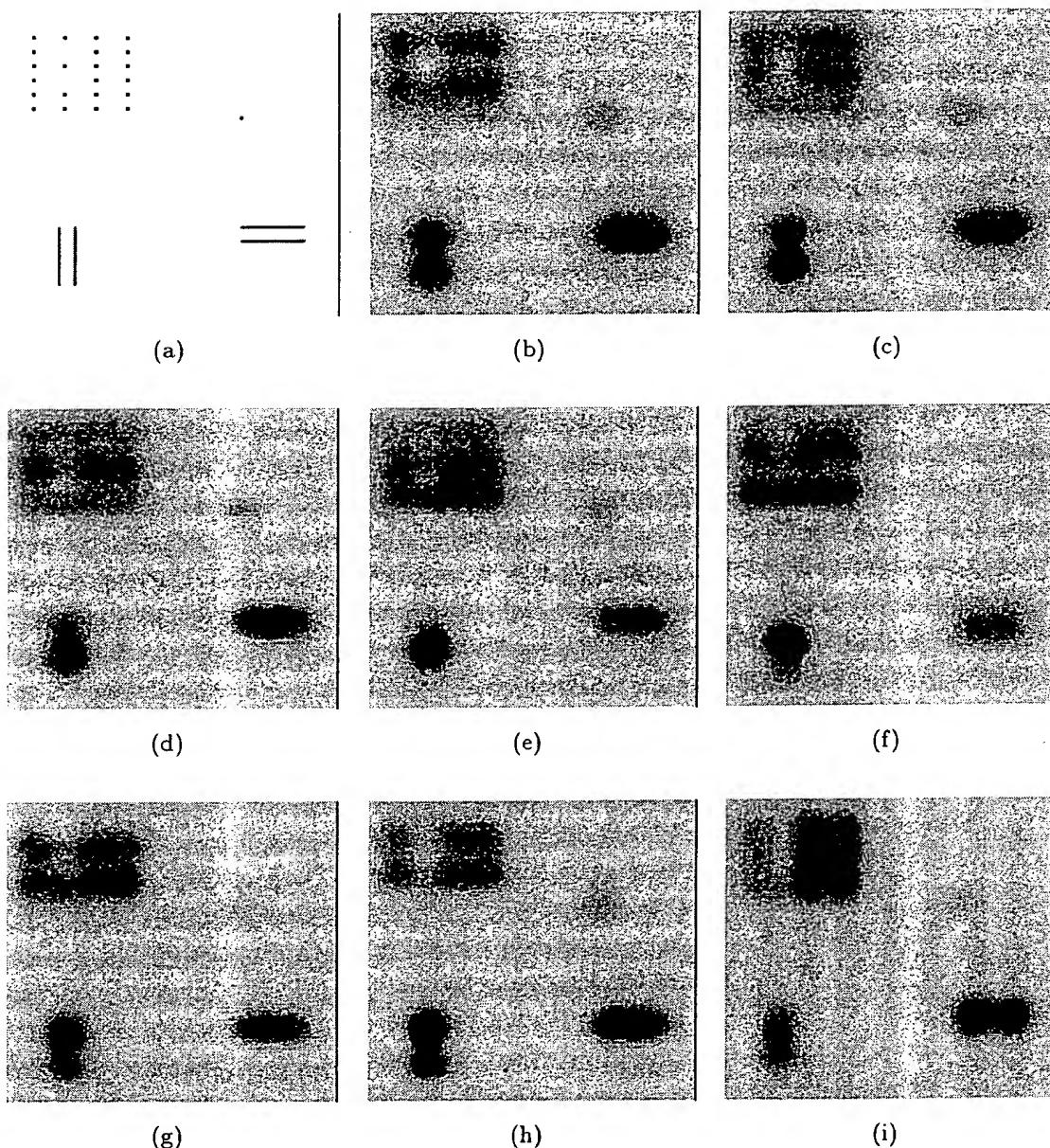


Abbildung 5: Eine Simulation des oben beschriebenen Verfahrens. a) Oben links ist das simulierte Objekt zu sehen, dessen Beleuchtung mit dem beschriebenen Verfahren und Abbildung mit einem Epifluoreszenzmikroskop in den folgenden Bildern simuliert wurde. b-h) Simulationen mit jeweils einer verschiedenen Phase des beleuchtenden Streifenmusters ($m=3, 7$ Bilder). i) Beispiel in dem auch die Richtung des beleuchtenden Musters verändert wurde. Die Einstrahlungsintensität war bei diesen Simulationen um den Faktor 5 größer als die Sättigungsintensität. Die maximale Photonenzahl betrug ca. 560 Photonen/Pixel in den Einzelbildern.

00000000

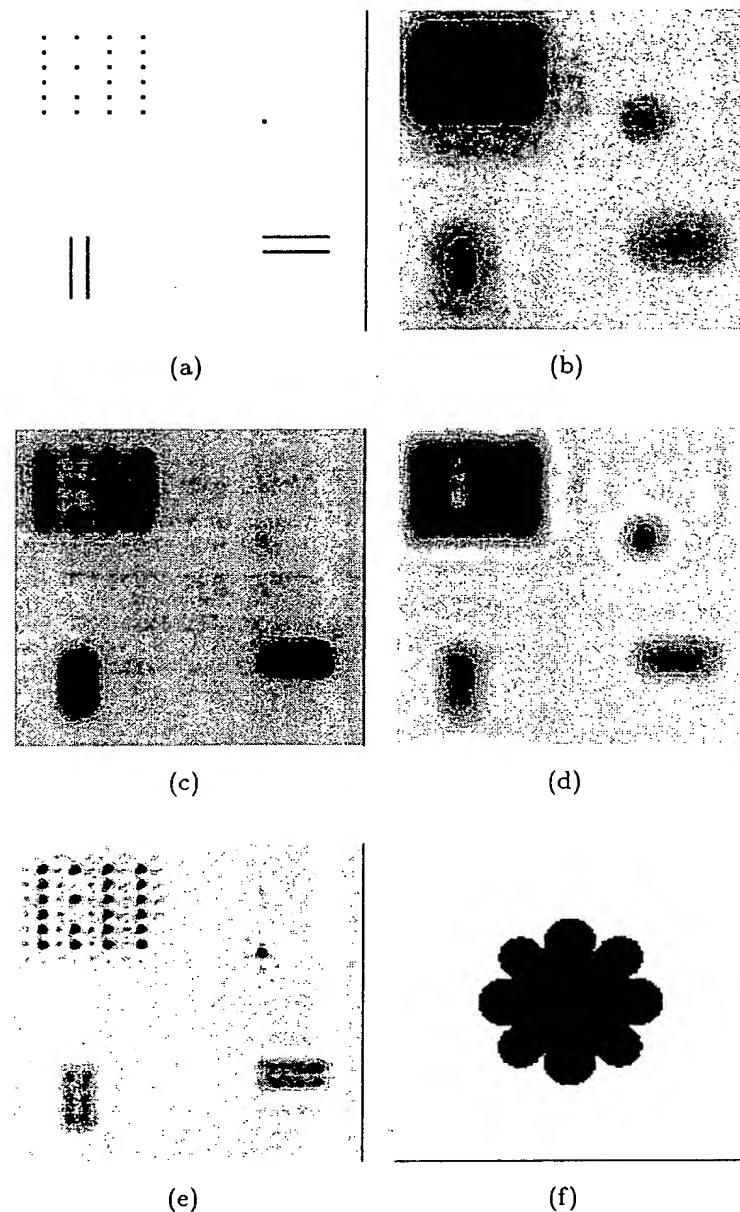


Abbildung 6: Eine Simulation von nach dem oben beschriebenen Verfahren simulierten und ausgewerteten Daten. a): Originalbild der Simulation. b) Nach Faltung mit der Punkt-
bildfunktion eines simulierten Mikroskops und poissonverteilter Verrauschung (Max=560
Photonen) c): Aus den Bildern in Abb. 5 rekonstruierte Aufnahme ohne Verstärkung ho-
her Raumfrequenzen. d): Wie b) mit zusätzlich angewandter Hochfrequenzverstärkung e):
Wie c) mit Hochfrequenzverstärkung. f): Dazugehöriger simulierter Träger der mit dem
Verfahren erreichten OTF bei einer berücksichtigten Anzahl von $m = \pm 3$ Maxima.

02.08.99

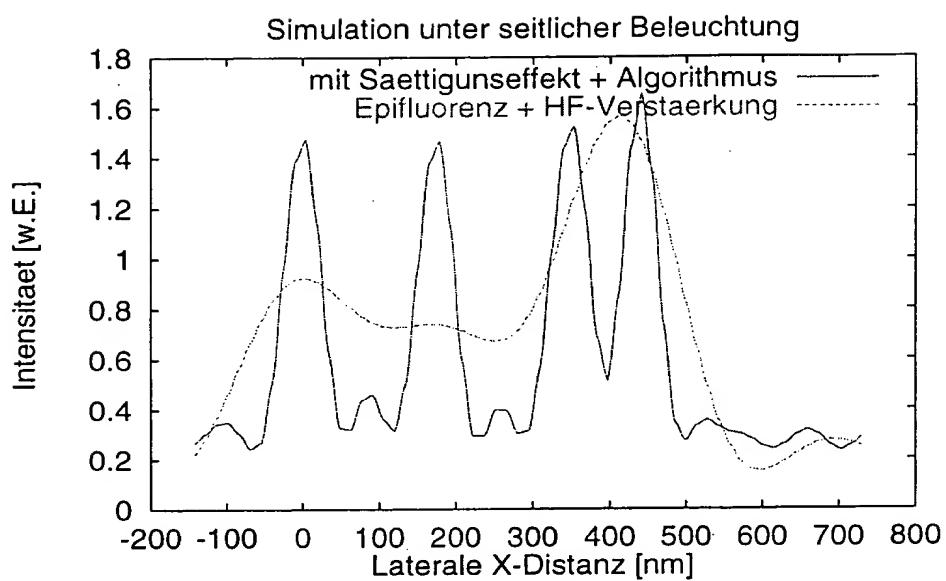


Abbildung 7: Intensität entlang einer Linie entlang der zweiten Spalte in der Punktmatrix in Abbildung 6 d) und e). Eine Verbesserung der Auflösung um einen Faktor von mehr als drei wurde bei der simulierten Abbildung eines Punktes erhalten.

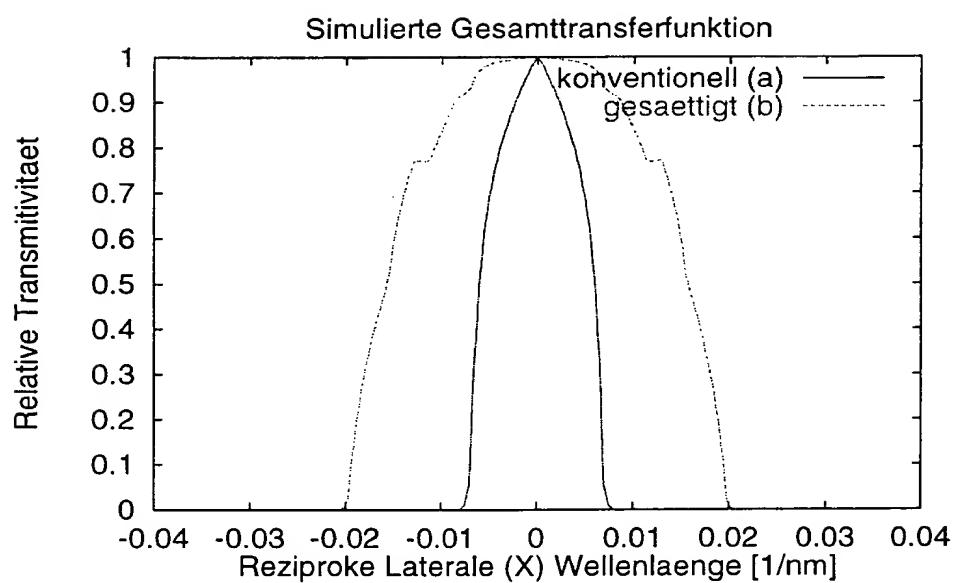


Abbildung 8: Darstellung der effektiven Transferfunktion des Gesamtsystems. (a) Bei einer konventionellen Abbildung mit einem Mikroskopobjektiv, bei nachfolgender Anwendung einer Hochfrequenzverstärkung. (b) Bei Anwendung der gesättigten Beleuchtung wie in Abbildung 6 simuliert, inklusive der Hochfrequenzverstärkung. Wie man sieht hat sich der Träger der Transferfunktion gegenüber (a) deutlich erweitert.

02.03.99

31

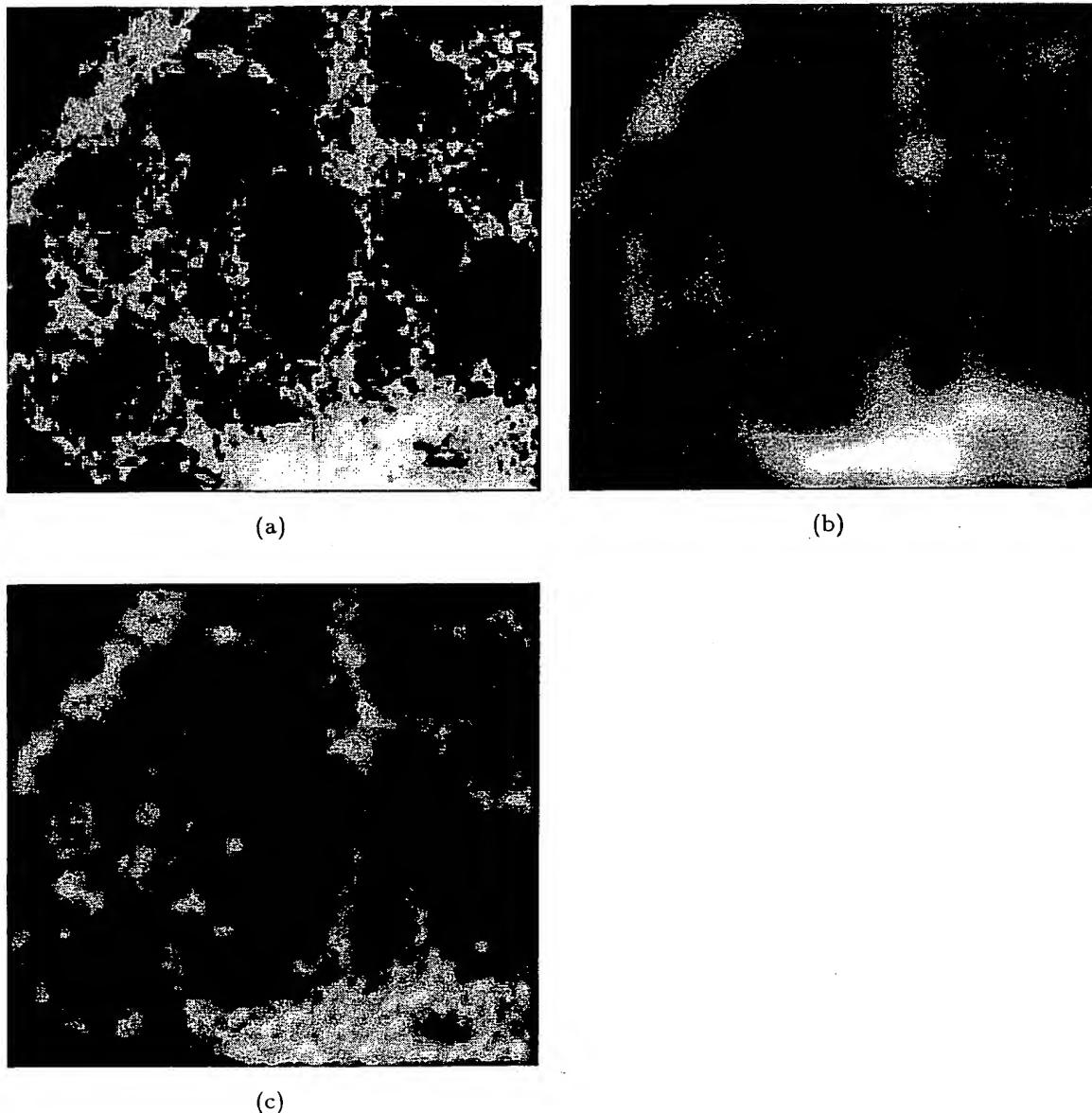


Abbildung 9: Eine simulierte Anwendung des Verfahrens auf ein mittels Elektronenmikroskopie aufgenommenes Schnittbild des Zellkerns einer embryonalen Bovin-Zelle. a) Invertierter elektronenmikroskopischer Ausschnitt nahe der Kernhülle mit der „nuclear matrix“. b) Simulierte epifluoreszenz-mikroskopische Aufnahme mit Entfaltung. c) Simuliertes mit der Methode gesättigter lateraler Modulation aufgenommenes und ausgewertetes und anschließend entfaltetes Bild (Maximum: 560 Photonen im Einzelbild). Die elektronenmikroskopische Originalaufnahme (a) wurde freundlicherweise von Jeril Degruard zur Verfügung gestellt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)